

文章编号:1005-6947(2004)03-0189-04

· 实验研究 ·

# 重组生长激素与大鼠模型肝癌增殖关系的研究

严德辉<sup>1</sup>, 严律南<sup>2</sup>

(1. 川北医学院附属医院 普外科, 四川 南充 637000; 2. 华西医科大学附属第一医院 普外科, 四川 成都 610041)

**摘要:**目的 研究重组生长激素(rGH, 思增)对大鼠移植型肝癌模型肿瘤细胞增殖的影响, 以了解rGH的使用对治疗肝癌是否有不利影响。方法 用腹腔移植型雄性种鼠的含肿瘤细胞的腹腔液接种于幼鼠的皮下, 制成皮下种植实体瘤鼠。接种7d后, 将实体瘤切成2 mm × 2 mm × 3 mm大小瘤组织块, 再将瘤组织块植于82只成年雄性大鼠的肝上而成移植型肝癌模型。随机均分成实验组和对照组。实验组术后第3天从尾静脉分别给予rGH 0.5 U/(kg · d)和生理盐水, 连续5d。手术后8, 10, 12d 3个时段处死。大鼠、肝脏、肿瘤组织称重, 全自动图像分析仪检测肝细胞及肿瘤细胞数目密度、核分裂数、核分裂指数; 术后第8天处死的大鼠同时行<sup>3</sup>H-TdR活体掺入计数。结果 除术后第8天对照组大鼠体重较术前明显减轻外( $P < 0.05$ ), 两组其他各时段术前术后差异均无显著性( $P > 0.05$ ); 肝重、肝细胞及肿瘤细胞数目密度、肿瘤重、核分裂数、核分裂指数, 同一时段两组间差异均无显著性( $P > 0.05$ ); 术后第8天<sup>3</sup>H-TdR活体掺入计数, 两组差异无显著性( $P > 0.05$ ); 肿瘤重量在同一组不同时段差异有极显著性( $P < 0.01$ )。结论 静脉注射rGH与大鼠移植肝癌细胞的增殖无明显关系。

**关键词:** 生长激素/药理学; 癌, 肝细胞; 疾病模型, 动物; 增殖; 肿瘤细胞, 培养的; 肝肿瘤, 实验性

中图分类号: R735.7; R977.1 文献标识码: A

## Study of the effect of recombinant growth hormone on the tumor cell proliferation in the transplantation liver tumor models in rats

YAN De-hui<sup>1</sup>, YAN Lu-nan<sup>2</sup>

(1. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637000, China; 2. Department of General Surgery, The First Hospital, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041, China)

**Abstract: Objective** To study the effect of recombinant growth hormone (rGH) on the tumor cell proliferation in the transplantation liver tumor models in rats, to explore the advantages and disadvantages of rGH in the treatment of liver carcinoma. **Methods** The male weaning rats were used to vaccinate and transgenerate by intraperitoneal injection of abdominal fluid containing tumor cells from the celiac transplantation tumor rats, the others weaning rats were used to be the solid tumor rats by subcutaneous vaccination with abdominal fluid of tumor cells. The solid tumor were divided into pieces (2 mm × 2 mm × 3 mm), which were inserted into the liver of the 82 adult male rats to establish the transplantation liver tumor models. and then the models were divided into experimental group and control group randomly. After 3 days, experimental group were given rGH (0.5 U/kg · d) and control group were given via caudal vein NS for 5 days. All the rats were killed in 8d, 10d, 12d, respectively. The rats, tumors and livers were weighted, the number of hepatocytes, carcinoma cells and mitotic index were measured, the number of <sup>3</sup>H-TdR incorporation in vivo was measured in 8 days after operation. **Results** There were no significant difference in all the results between the two groups, except the rats weight of 8 days after operation and the tumor weight in different phase. **Conclusions** The rGH has no significant effect on the proliferation of tumor cell in transplantation liver models in rats.

收稿日期: 2002-11-26; 修订日期: 2003-03-24。

作者简介: 严德辉(1965-), 男, 四川南充人, 川北医学院附属医院主治医师, 硕士, 主要从事肝胆胰临床与基础方面的研究。

**Key words:** CROWTH HORMONE/pharm; CARCINOMA HEPATOCELLULAR; DISEASE MODELS, ANIMAL; PROLIFERATION; LIVER NEOPLASMS, EXPERIMENTAL; TUMOR CELLS, CULTURED

**CLC number:** R735.7; R977.1

**Document code:** A

手术切除是目前治疗肝癌的主要手段。然而86.5%的肝癌患者合并有肝硬化<sup>[1]</sup>,术后残存的肝组织往往不能维持正常的肝功能,并发肝衰竭危及患者生命时有发生。促进残存肝细胞的再生,对预防肝衰竭的发生有着重要的意义。Askawa等<sup>[2]</sup>报道重组生长激素(rGH,思增)有强烈促进肝细胞DNA合成,刺激肝再生的作用。但对于肝癌患者手术后应用rGH是否会同时促进肿瘤细胞的增殖?这是普外医生关心的问题。本实验通过移植型肝癌模型研究rGH与肿瘤细胞增殖之间的关系,以明了rGH使用中是否有不利因素。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

rGH 20支,每支4U/3mg,由瑞士雪兰诺公司提供;<sup>3</sup>H标记脱氧胸腺嘧啶核苷(<sup>3</sup>H-TdR)3瓶,1mci/瓶(1mci=37MBq),由中科院上海核研究所提供;腹腔移植型种鼠(W<sub>256-2k</sub>)2只,由中英合资上海西普尔-必凯儿实验动物有限公司提供;SD雄性成年大鼠和幼鼠由华西医科大学实验动物中心提供;模型鼠系SD成年雄性大鼠,82只,200~300g;传代和皮下种植鼠为SD雄性幼鼠,10只,断乳1~2周,80~100g。

### 1.2 模 型 建 立

1.2.1 腹腔内传代鼠 种鼠腹部去毛,消毒,用5号针头抽出含肿瘤细胞的腹腔液约1.0~1.5ml(含肿瘤细胞 $1.0 \times 10^7 \sim 1.5 \times 10^7$ 个/ml),用其中0.5ml注入幼鼠( $n=4$ )的腹腔内,保种、传代,剩余的用于制备皮下种植实体瘤。7d后重复上述过程,连续3次传代保种。

1.2.2 皮下种植实体瘤鼠 将含肿瘤细胞的腹腔液注射到幼鼠( $n=6$ )的腋下或腹股沟皮下,每个注射点用0.3~0.5ml,共注射15处。7d后处死全部皮下种植鼠,手术切除皮下种植瘤块,剥去周围正常组织,去掉中心坏死组织,挑选出鱼肉状组织,切成2mm×2mm×3mm大小若干块,置于

生理盐水中,在2~3h内移植完。

1.2.3 肝癌模型鼠 SD成年大鼠82只,称重编号,随机均分为(1)实验组( $n=41$ );(2)对照组( $n=41$ )。模型制作:5%水合氯醛,按0.6ml/100g行腹腔注射麻醉,约2~5min见效,麻醉维持20~30min。切口处去毛消毒,作上腹约1.5~2.0cm的正中切口,显露肝左叶,用眼科剪刺破肝包膜,在包膜下作0.5~1.0cm的隧道,用眼科镊植入已备好的瘤组织块,确认瘤组织块未退出、无出血,关腹。3d后,自尾静脉给药,实验组用rGH 0.5U/(kg·d),稀释成0.5ml,对照组用生理盐水0.5ml,连续5d。

### 1.3 观 测 指 标

1.3.1 <sup>3</sup>H-TdR活体掺入计数 术后第8天,实验组和对照组各15只,于处死前4h由腹腔注入<sup>3</sup>H-TdR(300μci/kg,1μci=37kBq),取瘤体组织用FJ-2107液体闪烁计数器作<sup>3</sup>H-TdR计数。

1.3.2 大鼠、肝组织、肿瘤组织重量 实验组及对照组分别于术后8,10,12d3批处死,测定上述指标。肝组织、肿瘤组织用10%甲醛固定。

1.3.3 肝细胞数目密度、肿瘤细胞数目密度、核分裂数、核分裂指数(MI) 肿瘤组织、肝组织切片作HE染色,用图像分析仪(英国产Cambridge-Quantiment 970全自动图像分析仪)检测上述指标。细胞密度为每10个高倍视野下细胞总数;核分裂数为每10个高倍视野下核分裂细胞数;MI为核分裂数/细胞密度。

### 1.4 统 计 学 处 理

结果数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用State软件进行方差分析。检验水准为 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结 果

### 2.1 <sup>3</sup>H-TdR活体掺入计数

实验组与对照组<sup>3</sup>H-TdR计数分别是 $13\,148 \pm 1\,627$ 和 $12\,936 \pm 1\,873$ ,经统计学处理两者差异无显著性( $P>0.05$ )。

## 2.2 实验组与对照组术前术后体重、肝组织和肿瘤重量、肝细胞和肿瘤细胞数目密度、核分裂数、核分裂指数

虽经腹腔3次传代保种制作肝癌模型,用图像分析仪检测皮下种植鼠和模型鼠的肿瘤组织HE染色切片见细胞类型一致:肿瘤细胞呈多形性,异型性明显,胞核增大,胞浆少,嗜硷性,并可见较多核分裂现象,肿瘤内有血管浸润。实验鼠体重除对照

组在术后第8天明显减轻外( $P < 0.05$ ),其余各时段手术前后差异均无显著性( $P > 0.05$ );两组肝组织重量差异无显著性( $P > 0.05$ );肿瘤重量在同一时段两组间差异无显著性( $P > 0.05$ ),不同时段则差异极显著( $P < 0.01$ );肝细胞数目密度、肿瘤细胞数目密度、核分裂数、MI在两组之间差异均无显著性( $P > 0.05$ )(附表)。

附表 两组在各时段代谢和增殖的指标

观察指标	术后8d		术后10d		术后12d	
	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组	对照组
大鼠重量(g)术前	223 ± 17	225 ± 18 <sup>1)</sup>	245 ± 13	237 ± 16	238 ± 12	246 ± 22
术后	220 ± 10	201 ± 17	239 ± 15	226 ± 15	241 ± 10	241 ± 21
肿瘤重量(mg)	30 ± 15 <sup>2)</sup>	35 ± 12	57 ± 13 <sup>2)</sup>	60 ± 15	280 ± 52 <sup>2)</sup>	300 ± 68
肝组织重量(g)	8.5 ± 1.2	8.3 ± 1.4	9.8 ± 1.5	9.7 ± 1.3	9.3 ± 0.9	9.7 ± 1.2
肝细胞数目密度	1147 ± 372	1029 ± 285	1356 ± 117	1195 ± 134	1296 ± 128	1174 ± 273
肿瘤细胞数目密度	650 ± 70	660 ± 56	684 ± 79	719 ± 91	693 ± 95	725 ± 74
核分裂数	25 ± 3	37 ± 45	24 ± 2.6	28 ± 3.4	25 ± 4.2	32 ± 5.7
核分裂指数(MI)(%)	3.78 ± 0.85	4.3 ± 0.9	3.5 ± 0.97	3.28 ± 0.4	3.6 ± 0.58	3.74 ± 0.29

注:1)与同组术后比较 $P < 0.05$ ; 2)与同一指标不同时段比较 $P < 0.01$ ;其余各指标不同时段二组比较 $P > 0.05$

## 3 讨论

生长激素在代谢方面的影响主要是促进蛋白质合成,增加脂肪氧化分解,促进糖异生改善机体全身状况。然而从不同种属得到的GH,对别的种属的动物往往不产生效应,表现出明显的种属特异性,但大鼠对各种哺乳类GH均有反应<sup>[3]</sup>。rGH是第三代重组生长激素与人的生长激素(hGH)有着完全相同的版本。正常成人1dGH分泌量少于1mg,血中GH浓度小于5ng/ml<sup>[4]</sup>;而本实验所用的rGH是0.5U/(kg·d),连续5d,单次用量在单位体重下是正常人的20倍。用腹腔移植型种鼠(W<sub>256-2K</sub>)和SD雄性成年大鼠建立的移植型肝癌模型能较好地模拟人类肝癌的生长方式,且成功率高,故其结果应对临床有一定的指导作用。

大手术后3~5d的患者处于高分解代谢,即使使用全胃肠外营养(TPN)病人体重也会明显下降。有资料表明,术后用TPN+rGH,治疗组患者体重无

明显改变,而对照组明显下降<sup>[5]</sup>。本实验也有类似结果,术后第8天对照组体重明显降低,差异有显著性,而实验组则否。说明rGH确实能逆转分解代谢而改善机体全身状况。但本实验肝组织重量、肝细胞数目密度两组间差异均无显著性,与周勇等<sup>[6]</sup>报道不符。笔者认为这可能与肝切除有关。由于肝脏受损后有很强的再生能力,这种再生受到众多因子的调节,其中肝细胞再生因子(HGF)已被公认是最有效的调节因子<sup>[7,8]</sup>。有资料<sup>[9]</sup>显示在大鼠行肝切除后给予rGH处理,血中HGF明显升高。本课题未作肝叶切除,自然肝脏的这种再生能力未能被激发出来,故该2项指标有着与其他报道不同的结果。

Chang等<sup>[10]</sup>用放射受体法分析了人类肝癌细胞及癌旁硬化组织的肝细胞均缺乏GH受体。Hoshi等<sup>[11]</sup>报道肝癌细胞分泌的肿瘤生长刺激活性物(TGSA)能明显刺激肝癌细胞生长,而正常肝细胞产生的生长介素(SM)无TGSA的作用。GH发生效

应一方面直接作用于有 GH 受体的细胞,另一方面通过产生 SM 而发挥作用,就理论而言,rGH 对肝癌细胞无增殖作用。从目前临床所见 rGH 对肝癌患者的复发、转移也无明显的影响<sup>[12,13]</sup>。

rGH 究竟对肝癌细胞有无增殖作用,本实验从组织、细胞的角度进行了研究。选用<sup>3</sup>H-TdR 活体掺入计数可了解细胞增殖间期中 DNA 合成速度<sup>[14]</sup>,核分裂数和 MI 则可了解分裂期的情况。肿瘤组织重量和肿瘤细胞数目密度则对肿瘤增殖的总体上有一个定量了解。本实验<sup>3</sup>H-TdR 的掺入是在连续给予 5 d 处理后测定的,也就是说 rGH 正发挥着明显的作用。从所获结果可见,<sup>3</sup>H-TdR 活体掺入计数在两组间差异无显著性。核分裂数、MI 对许多肿瘤的诊断及恶性程度的判断都有重要意义,尤以 MI 更为重要<sup>[14]</sup>。Akerman 等<sup>[15]</sup>报告 MI 与淋巴瘤分类及预后的关系,在低恶性淋巴瘤中 MI 小,在高恶性淋巴瘤中 MI 高,MI < 2 与 MI > 2 的两组病例的存活有着明显差异。本文实验组的 MI 为 3.63%,对照组为 3.79%,差异无显著性 ( $P > 0.05$ );两组的核分裂数差异亦无显著性 ( $P > 0.05$ )。移植瘤细胞数目密度以及同一时段瘤组织重量在两组间差异均无显著性,但不同时段之间的瘤体组织重量差异有极显著性 ( $P < 0.01$ )。恶性肿瘤生长初期呈指数递增<sup>[14]</sup>,本资料也显示相类似的趋势。

从本实验对<sup>3</sup>H-TdR 活体掺入计数、核分裂数、MI、肿瘤组织重量和肿瘤细胞数目密度等指标的检测结果看来,静脉注射 rGH 与移植肿瘤细胞的增值无明显关系。

#### 参考文献:

[1] 吴阶平,裘法祖.黄家驷外科学[M].中册.第6版.北京:人民卫生出版社,2000.1136-1140.  
[2] Askawa K, Hizuka N, Takano K, *et al.* Human growth hormone stimulates liver regeneration in rats [J]. *J Endo Crinol Invest*, 1989, 12(3):343-351.

[3] Kalu DN, Drhii PB, Chen C, *et al.* Aged rodent models of long-term growth hormone the pack of deleterious effect on longevity [J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 1998, 53(6):452-463.  
[4] 曾民德,萧树东.肝脏与内分泌[M].济南:山东科技出版社,1999.71-75.  
[5] 冉江华,郭群,杨兴周,等.腹部大手术病人应用重组生长激素治疗 15 例体会 [A].雪兰诺公司.思增临床应用论文集[C].1999.91-92.  
[6] 周勇,吴言涛,贾乾斌,等.rGH 对肝部份切除术后促进肝再生的动物实验研究 [A].第五届全国普外基础与临床进展学术研讨会论文汇编[C].1998.938-939.  
[7] Nakamura T, Nawa K, Ichihara A. Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1984, 12(3):1450-1459.  
[8] Strain A, Ismail T, Tsubouchi H, *et al.* Native and recombinant human hepatocyte growth factors are highly potent promoters of DNA synthesis in both human and rat hepatocytes [J]. *J Clin Inves*, 1991, 12(3):1853-1867.  
[9] 王华,高健鹏,李智宇.重组生长激素对大鼠部份肝切除后肝再生影响的实验研究 [A].雪兰诺公司.思增临床应用的文集[C].1999.25-26.  
[10] Chang TC, Lin JJ, Yu SC, *et al.* Absence of growth hormone receptor in hepatocellular carcinoma and cirrhotic liver [J]. *Hepatology*, 1990, 11(1):123-145.  
[11] Hoshi. *Oncogenes and Growth Factors Elsevier* [M]. Amester-tan: Science Publishers, 1987.97-103.  
[12] 严律南,曾勇,文天夫,等.rGH 对肝叶切除术后肝脏再生作用的临床研究 [A].雪兰诺公司.思增临床应用论文集[C].1999.27-28.  
[13] 方学军,李朝龙.GH 在肝癌切除术后的临床应用及安全性研究 [A].雪兰诺公司.思增临床应用论文集[C].1999.39-41.  
[14] 高忠显,许树旭.现代肿瘤诊断治疗学[M].上册.北京:人民卫生出版社,1997.87-92.  
[15] Akerman M. Mitotic activity in non Hodgkins lymphoma relation of the Keil classification and to prognosis [J]. *Br J Cancer*, 1987, 55(2):219-230.